

风险监测

2013年中国桶装水铜绿假单胞菌的复核验证及耐药特征分析

胡豫杰¹,甘辛¹,闫韶飞¹,赫英英^{1,2},杨大进¹,裴晓燕¹,王伟¹,白莉¹,李凤琴¹,徐进¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021;

2. 山东大学公共卫生学院,山东 济南 250014)

摘要:目的 了解2013年中国21个省市自治区桶装水来源铜绿假单胞菌的鉴定正确率,对我国桶装水来源铜绿假单胞菌的耐药状况进行初步分析。方法 采用基于*eta2*和*oprI*两对基因的PCR方法对桶装水来源铜绿假单胞菌进行快速复核,使用Vitek GN生化鉴定卡进行生化验证,评价分离菌株的复核正确率和PCR方法的准确度,采用微量肉汤稀释法,对8类12种抗生素的耐药性进行测定。结果 两对引物均能对铜绿假单胞菌扩增出预期的目的条带,但*eta2*具有更高的特异性;抽样进行生化试验结果显示2013年各地上报并运送的菌株复核正确率为100%;两种基因的PCR方法准确度均在95%以上,但均存在较低比例假阴性;2013年中国21个省市自治区上报的531株铜绿假单胞菌耐药率为11.68%(62/531),主要耐受多粘菌素B(5.27%,28/531)、氨基糖苷(4.14%,22/531)和美罗培南(3.01%,16/531),替卡西林/克拉维酸和替卡西林的中介率分别为43.31%(230/531)和25.42%(135/531)。结论 各地上报分离的铜绿假单胞菌的准确性较高,PCR方法可对桶装水来源铜绿假单胞菌进行快速筛选,结合生化鉴定方法可准确鉴定。桶装水来源铜绿假单胞菌的耐药处于较低水平,但替卡西林/克拉维酸和替卡西林某种程度上显示了一定的耐药趋势,需要定期监测,以阐明桶装水中的铜绿假单胞菌的耐药特征和耐药趋势。

关键词:铜绿假单胞菌;PCR;生化;耐药;桶装水;水

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0235-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.020

Verification and analysis of antimicrobial resistance on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bottled water in China, 2013

HU Yu-jie, GAN Xin, YAN Shao-fei, HE Ying-ying, YANG Da-jin,

PEI Xiao-yan, WANG Wei, BAI Li, LI Feng-qin, XU Jin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective The aim of this study was to evaluate the identification accuracy and to acquire a preliminary analysis for antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bottled water in 21 provinces of China in 2013. **Methods** PCR method based on *eta2* and *oprI* genes was used in the rapid verification for *Pseudomonas aeruginosa* isolates, and biochemical method with Vitek GN cards was used as reference method. Broth microdilution method was used to obtain minimal inhibitory concentrations (MICs) of all 531 strains to 12 antibiotics belonging to 8 categories. **Results** *eta2* and *oprI* genes were validated by target bands and *eta2* was more specific. The results of biochemical test showed that the identification accuracy of all provinces was 100%. PCR method using two genes could achieve an accuracy over 95% with few false negative results. Among 531 *Pseudomonas aeruginosa* strains from 21 provinces in China, there were 62 (11.68%) drug resistant isolates in all, and these strains showed the highest resistance to polymyxin B (5.27%), followed by aztreonam (4.14%) and meropenem (3.01%). 230 (43.31%) and 135 (25.42%) of the strains tested were intermediate to ticarcillin-clavulanate and ticarcillin respectively. **Conclusion** The accuracy of *Pseudomonas aeruginosa* identification in all provinces was qualified, and PCR test could be a rapid and accurate screening method for detecting *Pseudomonas aeruginosa* in combination with traditional biochemical methods. Compared with clinical isolates, *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bottled water remained at low drug resistance level, but there was a potential

收稿日期:2016-01-08

基金项目:863计划“动植物源食品中内源有害物精准检测技术”课题资助(2012AA101603)

作者简介:胡豫杰 男 研究实习员 研究方向为食品微生物学 E-mail:huyujie@cfsa.net.cn

通信作者:徐进 男 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:xujin@cfsa.net.cn

tendency that strains may become more resistant to ticarcillin-clavulanate and ticarcillin to some degree, so regular monitoring was necessary to recognize antimicrobial resistance characteristics and tendency of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bottled water.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; PCR; biochemical; antimicrobial resistance; bottled water; water

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是常见的环境微生物,为临床检验的主要病原菌之一,主要引起伤口感染和化脓性病变。当人体免疫功能低下时,极易被感染并引发多种炎症,甚至引起脓胸和败血症等疾病,且该菌对消毒剂、干燥、紫外线灯等理化因素具有很强的抵抗力^[1-2]。以往认为该菌是条件致病菌,但近年研究证实,铜绿假单胞菌同时也是一种重要的食源性和水源性致病菌,能够通过污染食品(如肉制品和乳制品)而引发食物中毒^[3]。该菌广泛存在于各类型水体中,可用于评价水体的微生物污染状况,由于其生长可影响亚硝酸盐含量的变化^[4],并且能产生粘附素、多糖荚膜、内毒素和外毒素等多种致病因子^[5],威胁人体健康。

虽然桶(瓶)装水中有机物质含量极低,且刚出厂的产品中铜绿假单胞菌数量较少,但桶(瓶)装水消费周期较长,保存期至少半个月以上,兼性化能自养代谢而对有机营养要求低的铜绿假单胞菌可生长繁殖达到 10^4 cfu/ml^[6]。在水质卫生管理方面,美国、加拿大、巴西、日本、欧洲各国及世界卫生组织/粮农组织等,均限定瓶装饮用水(包括天然矿泉水水源)铜绿假单胞菌每升最大可能数(MPN) < 3或每250 ml中不得检出^[1]。基于我国现状,依据对包装饮用水的检测结果和国际食品微生物标准委员会(ICMSF)及我国相关标准中通常生产加工过程控制的要求,于2015年5月24日实施的GB 19298—2014《食品安全国家标准 包装饮用水》更新了原有饮用水和纯净水标准^[7],在致病菌方面增设了该菌作为检测指标,因此进行铜绿假单胞菌的快速分离与准确鉴定对评估包装饮用水微生物污染情况具有重要意义。

近年来,随着全球范围内桶装饮用水消费量的不断上升,国内外有关铜绿假单胞菌污染桶装水的报道逐渐增多^[1]。目前检测桶装饮用水中铜绿假单胞菌的传统生化培养方法,耗时较长且程序繁琐,分子生物学技术逐步应用于水样中该菌的快速检测。同时由于该菌自身天然耐药性及广谱抗生素的广泛使用,导致多重耐药铜绿假单胞菌感染的情况日益严重^[8],基于此,我国已于2013年起将该菌加入全国食品污染物和有害因素风险监测网的监测范围。2013年中国21个省市自治区上报分离自桶装水的铜绿假单胞菌共计531株,本文首先针

对PCR快速鉴定方法进行了特异性验证,然后按比例从上报的铜绿假单胞菌中挑选93株运用PCR方法快速复核上送菌株的鉴定情况,并通过生化方法验证该方法的准确性,采用微量肉汤法分析531株铜绿假单胞菌的耐药特征,初步了解我国桶装水来源铜绿假单胞菌的耐药情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2013年国内21个省市自治区参照GB/T 8538—2008《饮用天然矿泉水检验方法》^[9],使用滤膜法和假单胞菌琼脂基础选择性培养基(CN)从桶装水中分离出531株铜绿假单胞菌。标准菌株铜绿假单胞菌(ATCC 27853)购自美国典型菌种保藏中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

GelDoc XR凝胶成像仪、PCR仪、电泳仪均购自美国伯乐, Vitek2 Compact生化鉴定仪(法国bioMérieux), Nanodrop 1000 DNA浓度测试仪。

脑心浸液琼脂(BHA)、脑心浸液肉汤(BHI)、CN均购自北京陆桥技术股份有限公司, 抗生素(美国Sigma), Vitek GN生化鉴定卡(法国bioMérieux), 一次性微量细菌定量药敏MIC测试盒(天津市金章科技发展有限公司), PCR用Taq 2×PCR MasterMix和100 bp DNA Ladder均购自北京TIANGEN公司, 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 铜绿假单胞菌PCR快速检测方法的特异性验证

菌株DNA制备:从BHA平板刮取适量新鲜生长的菌落,研磨至灭菌水中,震荡混匀后置于金属浴100℃加热10 min,随即放入冰水浴2 min或置于-20℃冷冻10 min,12 000 r/min离心10 min,取上清即为菌株DNA模板,冷冻保存备用。

引物筛选:针对铜绿假单胞菌外毒素A基因 $eta2$ ^[10-11]和外膜蛋白编码基因 $oprI$ ^[12],预期扩增片段大小分别为396和236 bp,退火温度分别为65和55℃,引物序列分别为: $eta2$ -F: 5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3', $eta2$ -R: 5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'; $oprI$ -F: 5'-AATTCTCTGCTCTGGCTCTGG-3', $oprI$ -R: 5'-TTACTTGCGGCTG

GCTTTT-3'。

PCR 检测:分别按照文献[11-12]进行两种基因的 PCR 体系配制、扩增和产物电泳,并使用凝胶成像仪观察和保存电泳结果。

PCR 方法特异性验证:针对表 1 中 73 株不同种属常见食源性致病菌菌株提取 DNA 进行 PCR 评价所选 2 对引物的特异性。阳性标准菌株为铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

表 1 铜绿假单胞菌引物特异性验证菌株表

Table 1 Strains for verification of specific PCR primers for *Pseudomonas aeruginosa*

菌种名称	菌株种属	来源	菌株数/株
大肠埃希菌	<i>Escherichia coli</i>	ATCC/WHO-EQA	14
李斯特菌	<i>Listeria spp</i>	ATCC/CMCC	3
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC/CMCC/IFCC	4
芽胞杆菌	<i>Bacillus spp</i>	ATCC/CMCC	8
阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC	1
志贺菌	<i>Shigella spp</i>	ATCC/WHO-EQAS/IFCC	7
小肠结肠炎耶尔森菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC/CMCC	2
马红球菌	<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC	1
弯曲菌	<i>Campylobacter spp</i>	ATCC/WHO-EQAS	2
沙门菌	<i>Salmonella spp</i>	ATCC/WHO-EQAS/CMCC/IFCC	14
肺炎克雷伯菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	1
副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CFSA	3
恶臭假单胞菌	<i>Pseudomonas putida</i>	CFSA	1
温和气单胞菌	<i>Aeromonas sobria</i>	CFSA	2
椰毒酵母假单胞菌	<i>Pseudomonas cocovenenans</i>	CFSA	3
洋葱伯克霍尔德菌	<i>Burkholderia spp</i>	ATCC	4
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC/CFSA	3

注:ATCC 表示该菌购自美国典型菌种保藏中心;CMCC 表示该菌购自中国医学微生物菌种保藏管理中心;IFCC 表示该菌来自中国食品药品检定研究院实施的实验室比对验证计划考核;WHO-EQAS 表示该菌来自 WHO 委托丹麦科技大学组织的沙门菌和志贺菌血清分型及抗生素敏感性外部质量保证考核;WHO-EQA 表示该菌来自 WHO 委托欧盟疾病预防控制中心组织的产志贺毒素大肠杆菌分型外部质量保证考核;CFSA 表示该菌为本实验室保存的菌株

1.2.2 监测网上报菌株的复验证

从来源于国内 21 个省市自治区 2013 年分离自桶装水的 531 株铜绿假单胞菌中按照一定间隔,并在考虑各地上送菌株总数的比例下,按照 15% ~ 20% 比例抽样选择 93 株菌提取 DNA 模板,并针对 *eta2* 和 *oprI* 两对基因进行 PCR 快速检测,同时使用 Vitek2 Compact 仪器对 93 株上送菌株进行生化鉴定确证。以生化结果为准得出该批上送菌株的复核正确率,生化结果为铜绿假单胞菌的菌株为复核正确。以生化结果为准对基于两种基因的 PCR 方法进行比较,以 PCR 方法的误差率评价该 PCR 快速检测方法的准确度。相关计算公式如下:

复核正确率:

$$x = \frac{\text{生化结果为铜绿假单胞菌的菌株数目}}{93} \times 100\%$$

误差率:

$$y = \frac{\text{PCR 与生化复核不一致的菌株数目}}{93} \times 100\%$$

1.2.3 铜绿假单胞菌抗生素敏感试验

抗生素选择:根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)对铜绿假单胞菌抗生素敏感试验中微量肉汤稀释法推荐的抗生素种类,选择 8 类 12 种抗生素,分别为哌拉西林(PRL)、替卡西林(TIC)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、替卡西林/克拉维酸(TIM)、头孢他啶

(CAZ)、头孢吡肟(FEP)、氨曲南(ATM)、美罗培南(MEM)、多粘菌素 B(PB)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AK)、环丙沙星(CIP),采用一次性微量细菌 MIC 测试盒,获得抗生素的最低抑菌浓度(MIC)。

菌株活化与制备:将 -80 °C 保存的铜绿假单胞菌接种于 BHA 平板 37 °C 培养 24 h,挑取单个菌落转接 BHA 平板 37 °C 培养 24 h,挑取新鲜菌落至生理盐水混匀制成 0.5 麦氏浊度单位菌悬液。

接种培养:从 -20 °C 冰箱中取出药敏板放置待融化。按照 MIC 测试盒说明书,用无菌吸管滴加 10 滴菌悬液至接种池,加入 40 ml 稀释液,盖上接种器轻轻混匀,转移接种器至药敏板,轻轻按压若干秒待菌液与药液完全接触后提起接种器,盖上药敏板并置于 37 °C 培养 18 ~ 20 h。

结果观察:目测微孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度记录为该抗生素的 MIC 值,依据 CLSI 于 2014 年制定的《抗微生物药物敏感性执行标准第 24 版信息增刊》判断药敏结果,耐药为 R,中介为 I,敏感为 S。药敏试验质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)。

2 结果

2.1 PCR 方法特异性验证结果

PCR 结果表明,在用于铜绿假单胞菌引物特异

性验证的 73 株常见食源性致病菌株中, *eta2* 基因和 *oprI* 基因均能对 3 株铜绿假单胞菌扩增出预期条带, 但 *oprI* 基因同时对恶臭假单胞菌也扩增出预期条带大小相同的条带。对于非目标菌, *oprI* 基因在位于目的片段附近出现更多的杂带而影响判断。综合来看, *eta2* 基因针对铜绿假单胞菌的检测特异性较 *oprI* 基因高。

2.2 2013 年度上送铜绿假单胞菌复核结果及 PCR 快速复核方法评价

针对 93 株抽样验证用菌株, 分别使用 *eta2* 和 *oprI* 基因进行 PCR 检测, 两个基因分别存在 3 株和 2 株阴性结果。生化结果显示 93 株抽样验证菌株全部为铜绿假单胞菌, 该年度各地上送菌株的复核正确率为 100%。而基于 *eta2* 和 *oprI* 两种基因的铜绿假单胞菌的 PCR 快速筛选方法, 与传统生化方法相比准确度均在 95% 以上, 但均存在一定的假阴性, 误差率分别为 3.2% 和 2.1%。

2.3 铜绿假单胞菌耐药结果

在 531 株铜绿假单胞菌耐药检测中有 62 株耐药株, 耐药率为 11.68%。多粘菌素 B 耐药株数量最多为 28 株, 其他依次为氨基糖苷类 22 株、美罗培南 16 株、头孢他啶 10 株、头孢吡肟 6 株、替卡西林/克拉维酸 5 株、庆大霉素 5 株、环丙沙星 4 株、阿米卡星 4 株、替卡西林 4 株, 未检出哌拉西林和哌拉西林/他唑巴坦耐药株。230 株铜绿假单胞菌对替卡西林/克拉维酸耐药性介于中介度, 135 株铜绿假单胞菌对替卡西林中介。各种抗生素的耐药结果见表 2。

表 2 531 株铜绿假单胞菌的耐药结果

Table 2 Antibiotic susceptibility of 531 *Pseudomonas aeruginosa*

抗生素	耐药		中介	
	菌株数/株	耐药率/%	菌株数/株	中介率/%
多粘菌素 B	28	5.27	42	7.91
氨基糖苷	22	4.14	5	0.94
美罗培南	16	3.01	43	8.10
头孢他啶	10	1.88	4	0.75
头孢吡肟	6	1.13	6	1.13
替卡西林/克拉维酸	5	0.94	230	43.31
庆大霉素	5	0.94	3	0.56
环丙沙星	4	0.75	7	1.32
阿米卡星	4	0.75	0	0.00
替卡西林	4	0.75	135	25.42
哌拉西林	0	0.00	6	1.13
哌拉西林/他唑巴坦	0	0.00	9	1.69

耐受 1 种抗生素有 43 株, 耐受 2 种抗生素有 6 株, 耐受 3 种抗生素有 6 株, 耐受 4 种抗生素有 4 株, 耐受 5 种抗生素有 3 株。其中耐受多粘菌素 B 的菌株最多 (19 株), 最高耐受 5 种抗生素, 未见有同时耐受头孢菌素类、碳青霉烯类、氟喹诺酮类、氨

基糖甙类及 β -内酰胺类等 5 类抗菌物的菌株, 铜绿假单胞菌的耐药谱结果见表 3。

表 3 531 株铜绿假单胞菌的耐药谱

Table 3 Antibiotic resistance spectrum of 531 *Pseudomonas*

<i>aeruginosa</i>		
耐受抗生素数量	耐药谱	菌株数/株
0	敏感与中介	469
1	PB	19
1	MEM	11
1	ATM	7
1	CAZ	3
1	CIP	2
1	TIM	1
2	PB-ATM	3
2	ATM-CAZ	2
2	ATM-FEP	1
3	MEM-TIM-TIC	3
3	PB-ATM-CAZ	2
3	AK-GEN-PB	1
4	AK-GEN-ATM-FEP	1
4	CIP-PB-ATM-CAZ	1
4	GEN-ATM-FEP-CAZ	1
4	MEM-ATM-TIM-TIC	1
5	AK-GEN-PB-ATM-FEP	1
5	CIP-AK-GEN-ATM-FEP	1
5	PB-MEM-ATM-FEP-CAZ	1

3 讨论

本文针对两对 PCR 引物, 通过标准菌株进行敏感性和特异性验证, 结果表明 *eta2* 和 *oprI* 基因均可用于铜绿假单胞菌的筛选确认, 并具有较好的敏感性和特异性, 虽存在较低比例的假阴性, 可通过生化鉴定方法进一步确认。利用建立的 PCR 方法对 93 株铜绿假单胞菌进行鉴定, 同时以生化反应验证, 复核的 93 株菌均为铜绿假单胞菌, 表明 2013 年中国 21 个省市自治区上报桶装水中分离的铜绿假单胞菌的准确性较高。也说明建立的 PCR 法较为可靠, 可用于大量样品的快速筛选, 实现对铜绿假单胞菌的准确鉴定, 但引物设计仍需进一步优化, 以提高阳性率。

铜绿假单胞菌本身对多种抗菌药物表现为天然或获得性耐药, 而临床中特别是重症加强护理病房 (ICU) 的铜绿假单胞菌分离株的耐药性普遍较高^[13-14], 一方面抗菌药物的广泛不合理使用增加了细菌的环境压力, 导致细菌突变机会增加, 通过不同的耐药机制对药物产生耐药, 使得菌株产生耐药率呈上升趋势, 另一方面因临床治疗中使用多种导管、机械通气、人工吸痰等^[15], 使耐药菌的传播和导致感染的机会增加。由于某些种类抗生素的不合理使用, 铜绿假单胞菌被藻酸盐包裹后, 药物不仅难以到达菌体也不易被呼吸道防御机制杀灭, 使治

疗更加困难^[16]。目前饮用水中抗生素的存在关注度较高,是否在生活饮用水标准中设立抗生素的限量争议很大。本文对 2013 年 21 个省市自治区的桶装水中分离的 531 株铜绿假单胞菌进行了 12 种抗生素的耐药分析表明,相对于临床分离株而言,饮用水中铜绿假单胞菌分离株对所选择的抗生素总体较为敏感,平均耐药率为 11.68%,以多粘菌素 B 耐药率最高(5.27%),而其他各类抗生素的耐药率均在 5% 以下。值得注意的是,本研究中 230 株和 135 株铜绿假单胞菌分别对替卡西林/克拉维酸和替卡西林的耐药性介于中介度,中介度分别为 43.31% 和 25.42%,表明桶装水中的铜绿假单胞菌在这两种抗生素的选择压力下显示了一定的耐药趋势,需要持续监测,以阐明桶装水中的铜绿假单胞菌的耐药特征和耐药变化趋势,为科学评估饮用水中抗生素存在的潜在风险提供解释。

目前,多药耐药(MDR)及泛耐药(PDR)铜绿假单胞菌菌株几乎具有目前已知的细菌主要耐药机制,已成为引起院内获得性肺炎多重耐药革兰阴性菌的代表^[17-18],引起的院内感染治疗难度极大。本研究中桶装水分离出的铜绿假单胞菌暂未出现 PDR 菌株,但已出现 MDR 菌株,需要加强铜绿假单胞菌耐药及传播机制的研究,评估水源性铜绿假单胞菌耐药特征向临床铜绿假单胞菌传递的可能性。

参考文献

[1] 张淑红,吴清平,徐晓可,等.桶装水中铜绿假单胞菌检测方法的比较[J].现代食品科技,2011,27(11):1403-1405,1135.

[2] 郑晶,马骋,黄晓蓉,等.食品中绿脓杆菌检测方法的研究[J].食品科学,2007,28(7):419-424.

[3] 钱伯钦.假单胞菌属的新问题[J].国外医学:微生物学,1986,9(3):137-138.

[4] 马群飞.瓶装饮用水铜绿假单胞菌污染研究进展[J].微生物学免疫学进展,2003,31(2):95-98.

[5] 艾启俊,于庆华,张红星,等.PCR 技术检测编码绿脓杆菌外毒素 A 基因[J].中国食品学报,2006,6(6):117-120.

[6] 牛胜田.市售瓶装水的微生物质量及有关条例[J].国外医学卫生学,1994,21(1):31.

[7] 张旭东.食品安全国家标准 包装饮用水(GB 19298—2014)解读[J].饮料工业,2015,18(2):73,77.

[8] Kidd T J, Grimwood K, Ramsay K A, et al. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1):263-268.

[9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T 8538—2008 饮用天然矿泉水检验方法[S].北京:中国标准出版,2008.

[10] Khan A A, Cerniglia C E. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin a gene using PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(10):3739-3745.

[11] 张伟,李闻,张伟尉,等.基于 PCR 技术的绿脓杆菌快速检测方法研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(9):1065-1067.

[12] 杨曼琼.荧光实时定量 PCR 检测铜绿假单胞菌 *oprI* 基因方法的建立及运用[D].湖南:中南大学,2007.

[13] 陈建安,周静,张丽华,等.2006 至 2010 年铜绿假单胞菌分布及耐药性分析[J].实验与检验医学,2011,29(5):539-540,542.

[14] 施晓群,孙景勇,倪语星,等.2011 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(3):218-221.

[15] 黄艳新,姜朝新,王陈龙,等.464 株铜绿假单胞菌的耐药性分析及治疗[J].国际检验医学杂志,2013,34(6):752-754.

[16] 李苏利,华川.铜绿假单胞菌多重耐药及泛耐药研究进展[J].山西医药杂志,2013,42(8):891-892.

[17] 郑璇儿,杨杰.铜绿假单胞菌耐药性的基因学研究进展[J].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2014,8(1):123-125.

[18] 魏树全,赵子文.泛耐药铜绿假单胞菌耐药机制研究进展[J].医学综述,2009,15(2):261-265.

欢迎投稿《中国食品卫生杂志》网址:www.zgspws.com